

乙型肝炎患者血清游离和复合 HBV DNA 的研究

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: B200026005

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
博 士 学 位 论 文

乙型肝炎患者血清游离和复合  
HBV DNA 的研究

Study on Free and Complex HBV DNA in  
Patients with Hepatitis B

周 裕 林

指导教师姓名: 彭 宣 宪 教授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2004 年 11 月 30 日

论文答辩日期: 2004 年 12 月 9 日

学位授予日期: 2004 年 月 日

答辩委员会主席: 章晓波

评 阅 人: 林文雄 杨 丰

陈新华 王桂忠

陈清西 黄河清

2004 年 11 月

目 录

缩略语.....	I
中文摘要.....	III
英文摘要.....	V
一、前言.....	1
1. HBV 基因组及其主要功能蛋白 .....	1
2. HBV 感染慢性化机制研究进展 .....	11
3. 乙型肝炎病毒变异的研究进展.....	16
4. 乙型肝炎病毒免疫复合物的研究进展.....	21
5. 最新发展的几种 PCR 技术.....	23
6. 本论文研究的内容、目的及意义.....	31
二、材料与方法.....	33
1. 实验材料 .....	33
2. 技术路线 .....	39
3. 研究方法 .....	40
三、结果与分析.....	48
1. PCR 技术的建立.....	48
2. 各类 HBV DNA 的研究.....	52
3. 乙肝患者各类 HBV DNA 基因序列的研究.....	75
4. 7 例乙肝患者各类 HBV DNA 的动态研究.....	110
四、讨 论.....	125
1. 免疫捕捉法定量 PCR 技术是研究乙型肝炎各类 HBV DNA 的新的有效手段 .....	126
2. 游离和三类 Ig 复合 HBV DNA 在慢性乙型肝炎病变发展中具不同的病理生理意义 .....	130
3. 慢性乙型肝炎患者 HBV 感染常表现出异质性 .....	137

4. Ig 对 HBV 的中和是机体清除血清 HBV 的一种重要方式.....	140
五、小结.....	143
参考文献.....	144
致谢.....	161

## Table of Content

<b>Abbreviation .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract (in Chinese) .....</b>	<b>III</b>
<b>Abstract (in English) .....</b>	<b>V</b>
<b>Chapter I : Introduction .....</b>	<b>1</b>
1 HBV genom & major function proteins .....	1
2. HBV infection.....	11
3. HBV mutation.....	16
4. HBV immune complexes.....	21
5. New PCR methods .....	23
6. Objective & Meaning .....	31
<b>Chapter II : Materials and methods .....</b>	<b>33</b>
1 Materials .....	33
2 Technology Route.....	39
3 Methods .....	40
<b>Chapter III: Results .....</b>	<b>48</b>
1. Developing of PCR methods .....	48
2. Study on five forms of HBV DNA .....	52
3. Sequence of five forms of HBV DNA.....	75
4. Dynamics analysis of seven patients with hepatitis B.....	110
<b>Chapter IV: Discussion .....</b>	<b>125</b>
1. Immuno-capture quantitative PCR method may provide new and valuable insights into HBV pathogenesis .....	126
2. Free and Ig-complexed HBV DNA have different biological meanings.....	130
3. Multiply infection in HBV .....	137
4. The ability in Ig's binding with virus is important for clearing HBV ..	140
<b>Summary .....</b>	<b>143</b>
<b>Reference.....</b>	<b>144</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>161</b>

## 摘 要

HBV 是导致肝硬化和肝癌的主要因素。本文首先以羊抗人 IgM、IgG、IgA 和兔抗 HBsAg 多克隆抗体包被酶联反应板，分别捕捉乙肝患者血清中相应 Ig 复合的 HBV(Dane)颗粒和游离 Dane 颗粒，再利用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术对被捕捉的病毒 DNA 进行定量分析，从而建立了分别检测三类 Ig 复合 HBV DNA 和游离 HBV DNA 的免疫捕捉法定量 PCR 技术。通过阻断试验、中和试验、替代试验及对 PCR 扩增产物的核酸序列分析等试验证明，该技术特异性好、灵敏度高和重复性好。

采用该技术对 118 例慢性乙型肝炎患者血清标本进行检测，发现血清中游离 HBV DNA 含量明显高于三类 Ig 复合 HBV DNA，说明其 HBV DNA 的存在方式是以游离为主，提示既往对血清 HBV 的研究仅代表游离 HBV 的状态。

考察各类 HBV DNA 与临床指标的关系，发现三类 Ig 复合 HBV DNA 含量在 HBeAg 阳性组极显著高于阴性组，且 IgG 复合 HBV DNA 含量在肝功能正常组显著高于异常组。提示在 HBV DNA 高度复制期，Ig 对病毒的中和起着重要作用，尤其是 IgG 对 HBV DNA 的复合是机体自我保护、免除肝受损的一种重要手段。

针对 HBV 序列 S 区和 C 区，我们设计了两套引物，同时对患者各类 HBV DNA 进行套式 PCR 扩增，并进行序列分析，未发现与 Ig 复合 HBV DNA 有关的特异性变异，但发现各类 HBV DNA 存在不同的 HBV 感染谱。一类 Ig 在特定时间只能复合一种 HBV 感染株，而其游离 HBV 可能是多种 HBV 株的混合感染。不同的感染形式与疾病发展密切相关。

综上所述，本文采用创建的免疫捕捉法定量 PCR 技术，对慢性乙型肝炎患者血清游离和三类 Ig 复合 HBV DNA 进行了全面系统的研究，发现这些 HBV DNA 在乙肝疾病发展中具不同的病理生理意义，其结果为乙型肝炎慢性化机制的研究开辟了新思路 and 途径，为临床对乙型肝炎的诊断、预防和治疗提供实验依据和理论指导。

**关键词：**HBV； 免疫复合物； 免疫捕捉法定量 PCR 技术

## 缩 略 语

缩 略 语	中 文 解 释
ALT	谷丙转氨酶
AST	谷草转氨酶
Amp (Ampicillin)	氨苄青霉素
bp (Base pair)	碱基对
BSA (Bovine serum albumin)	牛血清白蛋白
cDNA ( Complementary DNA)	互补 DNA
d (Day)	天
Da (Dalton)	道尔顿
DBIL	直接胆红素
dNTP(Deoxyribonucleoside triphosphate)	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT (Dithiothreitol)	二硫苏糖醇
EB(Ethidium bromide)	溴化乙锭
EDTA(Thylene diaminetetraacetic acid)	乙二胺四乙酸
HBeAg	乙型肝炎 e 抗原
HBsAg	乙型肝炎表面抗原
HBV	乙型肝炎病毒
hr(hour)	小时
IPTG	异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖
Kb (Kilobase)	千碱基对
kDa (Kilodalton)	千道尔顿
min (minute)	分钟
mRNA(Messenger RNA)	信使 RNA

MS (mass spectrometry)	质谱
PBS(Phosphate buffered saline)	磷酸盐缓冲液
PCR(Polymerase chain reaction)	多聚酶链式反应
PEG (Polyethylene glycol)	聚乙二醇
pI (Isoelectric point)	等电点
rpm (revolution per minute)	每分钟转数
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	十二烷基硫酸钠
TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
TBIL	总胆红素
Tris	三 (羟甲基) 氨基甲烷
S ( Second)	秒钟
V (Voltage)	电压

## ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) is a major problem and a common cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In the present study, we developed immuno-capture quantitative PCR to detect three types of Ig-complexed HBV DNA and free HBV DNA. For this purpose, we used goat antihuman  $\mu$ ,  $\gamma$  or  $\alpha$  chain and rabbit anti HBsAg polyclone antibodies to capture IgM-, IgG- or IgA-bound HBV and free HBV, respectively and TaqMan primer fluorophore quantitative PCR to quantify HBV DNA in serum of patients with HBV infections. Our results showed that the approach was high specificity, sensitivity and repeatability by blocking, neutralizing, replacing and sequencing tests to these PCR products.

One hundred and eighteen chronic patients with hepatitis B were detected by the immuno-capture quantitative PCR. The amount of free HBV DNA was significantly higher than that of three isotypes Ig complex HBV in these patients, suggesting that the major presence of HBV DNA in serum is free HBV DNA.

Association of three isotypes of Ig complex HBV DNA with clinical markers showed that the amount of each of three isotypes of Ig complex HBV DNA in HBeAg positive group was significantly higher than that in HBeAg negative group, and the amount of IgG complex HBV DNA in normal liver function group was significantly higher than that in abnormal liver function group. Our findings suggest that the ability in Ig's binding with virus is important for clearing HBV when the virus was in actively replication phase, especially the IgG complex HBV DNA, which is an important means of host auto-safeguard and avoiding liver damage.

We designed two series of primers for HBV S and C region, and amplified by nested PCR and sequenced five forms of HBV DNA in patients with hepatitis B. There were no special mutations along with Ig complex HBV DNA, but there are different HBV infected series in different forms of HBV DNA. One isotype Ig can only complex one type of HBV genotype and free HBV DNA may have



multiply HBV genotypes. The HBV infected series are association with disease development.

In summary, we entirely study free and three isotypes of Ig complex HBV DNA in patients with hepatitis B by immuno-capture quantitative PCR method which developed by ourselves. The results showed these forms of HBV DNA have different biological meanings. The findings in this study may provide new and valuable insights into HBV pathogenesis.

**Key words:** hepatitis B virus (HBV); immune complexes; Immuno-capture quantitative PCR method

# 第一章 前言

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)引起的一种世界性疾病,据1996年世界卫生组织统计表明,全世界至少有30%的人口约20亿人感染过HBV,慢性HBV携带者达到约3.5亿人<sup>[1-2]</sup>。

我国是乙型肝炎的高流行区,人群 HBV 感染率高达 40%-60%,超过 8%的人口为 HBV 携带者<sup>[1-2]</sup> (图-1-1)。受 HBV 感染的人群有急、慢性肝炎和无症状携带等多种临床表现。据统计,目前我国慢性乙型肝炎患者约 2.8~3 千万,其中约 1/4 的慢性乙型肝炎患者会发展为肝硬化,部分患者还可进一步发展为肝癌<sup>[3,4]</sup>。而肝癌是我国导致死亡的主要疾病之一,每年有 16 万人因原发性肝癌死亡,因肝硬化等死亡者则为数更多<sup>[5,6]</sup>。所以,对乙型肝炎的研究一直是我国也是国际医学界的重要课题。

Geographic Distribution of Chronic HBV Infection

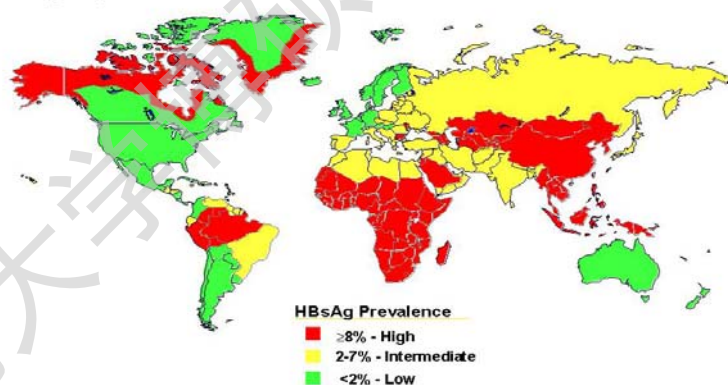


图-1-1 慢性乙型肝炎感染全球分布图 (引自 Manoney, 1999,参考文献 1)

Fig. 1-1 Geographic distribution of chronic HBV infection.(from Manoney, 1999, reference 1)

## 1. HBV 基因组及其主要功能蛋白

自 Blumberg 等 1965 年首次发现澳大利亚抗原 (Australian antigen) 和

1970 年 Dane 等在电镜下鉴定了 Dane 颗粒（即 HBV 颗粒）以来，国内外对乙型肝炎病毒的研究不断深入。有关 HBV 的基因组结构、编码蛋白、合成途径、装配途径等问题已基本被阐明<sup>[7-12]</sup>。

### 1.1 HBV 基因组

HBV 属嗜肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae)，直径 42nm，最早由 Dane 等作电镜描述<sup>[7]</sup>，故又称 Dane 颗粒。Dane 颗粒在电镜下呈双层外壳的圆形颗粒，直径约 42nm，分核心及外壳两部分。核心颗粒为 20 面体的对称结构，直径约 27nm，内含环状双股 DNA 和多聚酶，其外是脂蛋白外膜，约 7nm<sup>[13]</sup>。脂蛋白外膜约含 30% 的脂类和 70% 的蛋白质。HBV 是已知最小的真核细胞 DNA 病毒之一，是一种逆转录病毒，基因组结构相当精密、独特，为一全长约 3.2kb 的小环形 DNA。HBV DNA 双链长度不对称，全长的负链与病毒 mRNA 互补；正链仅 5' 末端固定，长度约 1700-2600nt。HBV 基因组一个最显著的特点是 HBV 可利用开放读码框(ORF)之间的相互重叠编码蛋白质，如 C 区与其它 ORF 重叠序列占其长度的 27%，S 区则全部包含于 P 区内，从而使其基因利用率达 150-200%<sup>[14-16]</sup>。

HBV 负链有 4 个开放读码框：S、C、P 和 X，分别编码膜蛋白、核壳、聚合酶和 HBx 蛋白<sup>[17]</sup>（图-1-2）。S 开放读码框分别编码 S 基因、preS2 区和 preS1 区，三者各有其起始密码 ATG；preS 的氨基酸变异率（15%）较 S 的（7.5%）多一倍，提示 preS 蛋白对病毒装配不及 S 蛋白更具关键性<sup>[18-22]</sup>。C 开放读码框分为 C 基因和前 C 区（preC），各有起始密码 ATG，该段最为保守，是免疫攻击的 CTL 靶表位主要所在，其变异易引起乙肝病毒的持续感染<sup>[23,24]</sup>。P 编码区很长，与 C、pre-S、S 及 X 编码区亦有重叠，编码 HBV-DNA 聚合酶，该酶具逆转录酶活性，与病毒复制有关<sup>[25,26]</sup>。X 基因是一种重要的反式调节因子，具有转录激活功能，一般认为 X 基因、HBx 蛋白与肝细胞癌的发生有关<sup>[27,28]</sup>。

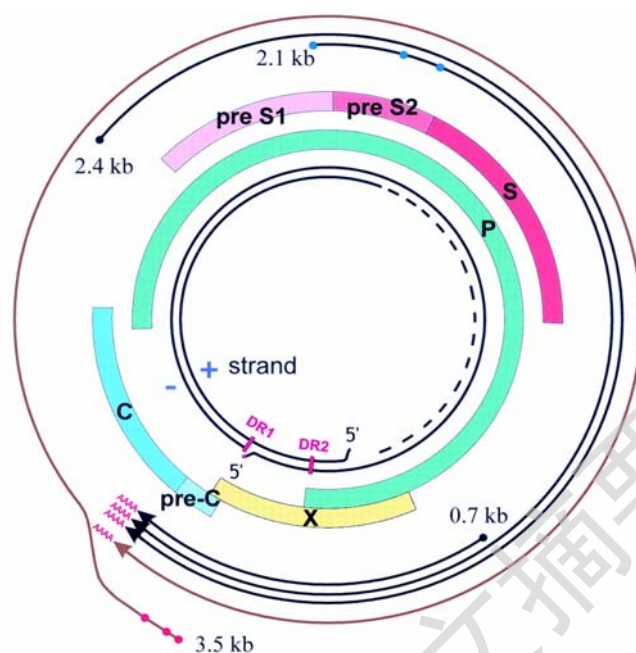


图-1-2. HBV 病毒基因组结构 (引自 Kidd-Ljunggren K, 2002)

Fig. 1-2. Schematic representation of the HBV genome showing four main classes of transcript (arrows), the longest of which corresponds to pregenomic RNA (brown). Variations in 5' end positions for the 2.1 and 3.5 kb size classes are shown with blue and red dots, respectively. Coloured boxes represent protein-coding regions. DR1 and DR2 are 11 bp repeat sequences with template functions during replication.(from Kidd-Ljunggren K, 2002)

## 1.2 HBV 编码的病毒蛋白

HBV 基因组编码合成的病毒蛋白有两类：结构蛋白有外膜和核壳蛋白用于组装完整的病毒颗粒；功能蛋白有聚合酶和 X 蛋白用于病毒的复制过程。但结构蛋白中亦含有不是构成病毒必需的前 S2 蛋白和 HBeAg，为病毒在易感群体中扩展和持续感染所必需。

### 1.2.1 外膜蛋白

HBV 的外膜蛋白包裹毒粒，使病毒能由感染的细胞分泌，并能附着和侵入新的细胞<sup>[29]</sup>；外膜蛋白也是引起宿主保护性应答的免疫原表位<sup>[30]</sup>。

HBV 的外膜(envelope)由开放读架 S 基因(S-ORF, 核苷酸 nt2854-832)编码合成，包括三种外膜成分：大、中和主蛋白，埋在来自宿主细胞膜的双层脂质中（图-1-3）。其中主要是主蛋白，即 HBsAg，由 226 个氨基酸

(nt156-832) 组成, 非糖化型 (P24) 和糖化型 (GP27) 约各占半量, P24 和 GP27 是以双硫键 (-S-S-) 联结的双体, 是携带全部抗原反应性的结构单位; 中蛋白是在主蛋白的氨基端扩加 55 个氨基酸, 有单和双糖化型 (GP33、GP36), 扩加部分为前 S2 (nt3212-115); 大蛋白是在中蛋白的氨基端再扩加 108 至 119 个氨基酸, 非糖化 (P39) 或糖化 (GP42), 扩加部分为前 S1 (nt2854-3211) [31,32]。

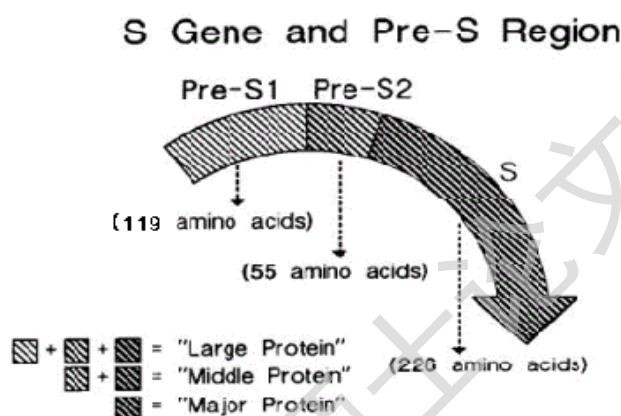


图-1-3. HBV 膜蛋白示意图

Fig.1-3. Schematic representation of HBV envelope proteins

三种蛋白分子有共同的羧基末端, 而分别有各自的起始密码 (ATG) 的氨基端。前 S1 和主蛋白是构型性的, 前 S2 蛋白则是线性的<sup>[33]</sup>。

主蛋白有两段信号肽: 信号肽I近氨基端插入内质网 (ER) 膜, 其后的亲水序列 (内亲水攀) 留在胞浆内, 出芽后仍在毒粒内部; 信号肽II亦插入 ER 膜, 其后的亲水序列暴露在毒粒表面, 是 HBsAg 的主要表位。表位肽段中有许多半胱氨酸, 其间的双硫键使这一区段形成几个稳定的攀环。羧基端部分亦有很强的亲水性, 与病毒颗粒的形成和分泌有关。中蛋白的前 S2 位于 S 蛋白上游。进入 ER 腔内, 出芽后仍在毒粒表面。大蛋白的前 S1 在前 S2 的上游, 全序列位于毒粒外表<sup>[34,35]</sup> (图-1-4)。

**Fig.1-4. Relationship of the ‘a’ determinant of the HBsAg protein with the surface of HBV virions.** (from Joseph Torresi,2002)

完整的病毒颗粒 (Dane particle) 直径 42nm, 同时含三种外膜蛋白, 仍以主蛋白为主, 中蛋白 5%-10%, 而大蛋白可达 20% (图-1-5)。大蛋白暴露在病毒的表面, 似为成熟病毒颗粒的必要成分。即使在病毒活跃复制的病人, 此种含病毒核心的外膜颗粒亦远较空缺的外膜颗粒为少。90%以上的外膜蛋白过剩, 并不组装成病毒颗粒<sup>[37,38]</sup>。可举一个典型个例, 说明三种外膜蛋白在病毒携带者血液中的存在情况: 1ml 血液中含  $10^8$  个病毒颗粒,  $10^{10}$  个管型颗粒和  $10^{13}$  个小球形颗粒<sup>[39]</sup>。

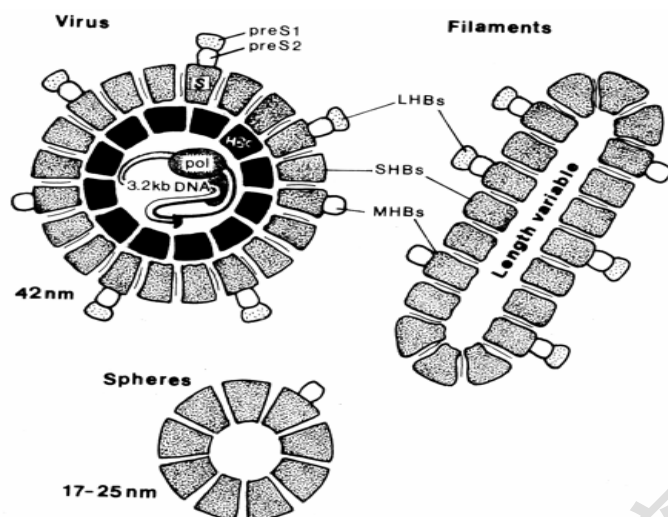


图-1-5 肝病毒颗粒结构图 (引自 Kann,1997,参考文献 39)

**Fig. 1-5.** Schematic diagram of hepadnavirus particles. Individual subunits containing SHBs protein only, HBs protein plus pre-S2 (MHBs), and HBs protein plus pre-S1 and pre-S2 (LHBs) are shown in intact virus, among filaments and spheres. The virus particles contain an internal nucleocapsid (HBc) and viral genome. pol, polymerase. (from Kann, 1997, reference 39)

### 1.2 .1.1 外膜蛋白与 HBV 病毒分型

1968 年乙型肝炎病毒(HBV)的抗原(即澳大利亚抗原)首先被发现, HBV 毒株的基因型(genotype)不同,其表现型(phenotype),即其编码蛋白的抗原性亦不相同<sup>[40]</sup>。因此,1972 年 Le Bouvier 等<sup>[1]</sup>提出根据 HBV 表面抗原(HBsAg)血清反应的不同而分为不同亚型,即血清型分型概念。

蛋白的亲水性和抗原性是一致的。HBsAg 有两个亲水区: AA32-76 和 AA110-156。如天然 HBsAg 中,亲水的赖氨酸被化学改变,抗原活性将消失,而所有赖氨酸都在 AA121-160 区段中,提示这一区段可能含有亚型共同抗原决定簇(determinant)。AA139-147 是共同族抗原(common group determinant)  $\alpha$  的免疫原性所必需的最小序列<sup>[41,42]</sup>。

主蛋白还携带两对相互排斥的亚型决定簇(subtype determinant) d/y 和 w/r,由此组成 HBsAg 的主要亚型: adw、adr、ayw 和 ayr。AA122-134 指令 d/y 决定簇,AA139-147 指令  $\alpha$  决定簇,AA159-160 指令 w/r 决定簇。最

简单的方法以 AA122 的赖/精氨酸(AAG/CGG)判定 d/y 的特异性、以 AA160 的赖/精氨酸(AAA/AGA)判定 w/r 的特异性<sup>[43]</sup>。

亚型 w 和 r 还可进一步细分,将 w 分为 w1-4, ayw 就有 ayw1、ayw2、ayw3 和 ayw4, adw 又有 adw2 和 adw4; r 分为 r、rq+和 rq-, 就出现了 ayr、adrq+和 adrq-。不同亚型在外膜蛋白的前 S 区,全基因组序列亦有相应的差异。Galibert 等<sup>[2]</sup>于 1979 年第 1 次解读了 HBV ayw 血清型基因组的核苷酸序列,长度为 3182 nt。

随着研究的深入,学者们发现外膜蛋白表现型的 HBV 亚型分类,并不能确切反映病毒基因的异质性。1988 年 Okamoto 等<sup>[3]</sup>首次提出 HBV 基因型的概念,即根据各基因组之间差异大于 8%而人为的将病毒群划分为不同的基因型,1990 年 Norder 等<sup>[4]</sup>基于多聚酶链反应(PCR)方法建立了简便的基因型别分析方法,之后学者在研究中不断提出存在新的基因型。目前根据 S 基因的核苷酸差异、推导的氨基酸差异,将 HBV 分为 8 种基因型,分别为 A、B、C、D、E、F、G、H 型<sup>[5]</sup>,基因型分布具有一定的地理特征,A 型主要分布在北欧、西欧和北美,B 和 C 型流行于东亚和远东,D 型分布广泛,在地中海、印度、近东和中东地区多见,E 型流行于西撒哈拉地区,F 型主要在美洲大陆流行,G 型主要在美国<sup>[6]</sup>,H 型在中美洲流行<sup>[7]</sup>。国内主要的基因型为 B、C 两型<sup>[8-9]</sup>,台湾学者报告提示除 E 型外,其他基因型均可在华人 HBV 感染者中被检出,B 和 C 型占患者人群的 85%<sup>[10]</sup>。我国常见的 adw 亚型不止 1 个基因族、而 adr 则只在 C 族<sup>[44]</sup>。

### 1.2.2 核壳蛋白

核壳蛋白有结构性的 HBcAg 和分泌性的 HBeAg,对感染的持续和发病机制都是关键性的<sup>[45]</sup>。

HBV 的 C 基因以第一和第二个 ATG 密码区分前 C 和 C 区。前 C-ATG 在 nt1814,前 C-mRNA 始于前 C 区的上游,不包裹进核心,编码 HBeAg。C-ATG 下游的几个核苷酸之后,有帽、聚(A)尾,长 3.3-3.6kb。部分 C-mRNA



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库